

УДК 576.895.42

**ПЦР ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК ХОЗЯЕВ-ПРОКОРМИТЕЛЕЙ НИМФ  
ТАЕЖНОГО КЛЕЩА (*IXODES PERSULCATUS*: *IXODINAE*)  
В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ И ЕГО ОКРЕСТНОСТЯХ**

© Л. А. Григорьева,<sup>1</sup> А. В. Марков<sup>2</sup>

Зоологический институт РАН

<sup>1</sup> Университетская наб., 1, С.-Петербург, 199034

E-mail: tick@zin.ru

<sup>2</sup> ООО «НПФ „ХЕЛИКС”»

<sup>2</sup> Большой Сампсониевский пр., 20-а, С.-Петербург, 194044

Поступила 25.08.2011

Проведена ПЦР идентификация ДНК хозяев-прокормителей из голодных самок и самцов *Ixodes persulcatus* (всего 143 образца), собранных из природы в апреле—июне 2008 и 2009 гг. Амплификация каждого образца выполнялась с использованием видоспецифичных по 12S рДНК митохондриальному гену праймеров, проанализированы 4 вида мелких млекопитающих (*Apodemus uralensis*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus arvalis*, *Sorex araneus*) и 2 вида воробьинообразных (*Fringilla coelebs*, *Parus major*). Для 44 образцов (30.8 % материала) установлены хозяева-прокормители, в 5 (3.5 %) случаях выявлено питание более чем на одном хозяине.

**Ключевые слова:** иксодовые клещи, паразито-хозяинные связи, *Ixodes persulcatus*, полимеразная цепная реакция.

Таежный клещ — треххозяинный паразит, который на каждой фазе развития питается на новом хозяине — прокормителе. Трофические преференции разнообразны, могут отличаться на разных фазах и включают сотни видов млекопитающих, птиц и даже рептилий (Таежный..., 1985; Балашов, 1998, 2010). Информацию о хозяевах-прокормителях иксодовых клещей до недавнего времени получали исключительно в результате сборов-очесов отловленных прокормителей. Так что достоверность данной информации определяется во многом возможностями отлова из природы тех или иных прокормителей.

С целью определения хозяев проводились спектрометрические исследования остаточных белков крови прокормителей в кишечном содержимом клещей (Wickramasekara et al., 2008). Однако наибольшей эффективностью отличаются работы зарубежных исследователей на европейском лесном клеще (*Ixodes ricinus* L.) с использованием молекулярных методик. Они позволили скорректировать список и значимость разных видов его

прокормителей для Западной Европы (Cadenas et al., 2007; Humair et al., 2007). Подобные работы в России нам не известны, однако информация, уточняющая списки прокормителей и их значимость для *I. persulcatus*, чрезвычайно важна вследствие огромной эпидемической и эпизоотической роли этого вида, его способности к трансмиссии возбудителей клещевого энцефалита, иксодовых клещевых боррелиозов, эрлихиозов и других заболеваний, которые в большинстве образуют природные очаги, поддерживаемые циркуляцией их возбудителей между клещем-переносчиком и хозяином-прокормителем. На разных территориях огромного ареала распространения таежного клеща значение разных видов прокормителей изменяется, что связано не только с природными экологическими особенностями прокормителей, но с особенностями антропогенного влияния.

Питаясь продолжительное время на хозяине, клещ получает достаточное для дальнейшего развития и линьки количество крови прокормителя, которую он переваривает уже после отпадения в течение длительного времени, так у нимф этот процесс растягивается на 2 мес (Григорьева, 2004, 2009). Оставшиеся в кишечнике после пищеварения продукты содержат на период активизации особей следующей фазы развития ДНК хозяина-прокормителя. Даже через 280 дней после питания нимф *I. ricinus* в кишечнике выплодившихся и активизировавшихся имаго обнаруживали ДНК прокормителя (Kirstein, Gray, 1996). Идентификацию ДНК хозяев-прокормителей проводят с использованием ядерного 18S рРНК (Pichon et al., 2003, 2005) или митохондриального 12S рРНК (Humair et al., 2007) и 12S рДНК (Cadenas et al., 2007) генов, что дает возможность выделить не только основные группы позвоночных-прокормителей, но и определить хозяина крови до рода и вида, используя видоспецифичные праймеры.

В нашей работе были проведены исследования голодных имаго таежного клеща на следующие виды позвоночных-прокормителей, мелких млекопитающих: *Apodemus uralensis*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus arvalis*, *Sorex araneus*, которые входят в список одних из основных прокормителей для нимф на Северо-Западе России и двух широко распространенных видов воробьинообразных *Fringilla coelebs*, *Parus major*. При этом выбранная схема амплификации основывалась на митохондриальной 12S рДНК, так как ее количество значительно больше, чем ядерной, практически отсутствующей в эритроцитах крови млекопитающих.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Сборы клещей. Голодных самок и самцов *Ixodes persulcatus* (всего 143 образца), собранных из природы в апреле—июне 2008 и 2009 гг. в Санкт-Петербурге и его окрестностях, фиксировали и хранили в 70°-ном этиловом спирте.

Выделение ДНК. Для проведения ПРЦ анализа по идентификации хозяина-прокормителя клещей была выделена тотальная ДНК из каждого клеща отдельно с использованием фенол-хлороформной методики. Для этого образцы замораживали в жидком азоте и измельчали до гомогенной массы, после чего проводился лизис в 2 % SDS (sodium dodecyl sulfate) с протеиназой К. Очистка проводилась трехкратной обработкой фенол-хло-

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности видоспецифичных праймеров

Table 1. DNA sequences of species-specific primers

№	Название вида	Последовательность праймера
3	<i>Apodemus uralensis</i>	TAAACTTAAATAATTTTAT
4	<i>Clethrionomys glareolus</i>	CCCTAAACTTCATCATTATA
5	<i>Sorex araneus</i>	GGTATTTAACCTAACAAAAATAC
6	<i>Fringilla coelebs</i>	TGATGCTTACCCCTACTAA
7	<i>Parus major</i>	TTGATGCTCGATATTACCTG
8	<i>Microtus arvalis</i>	CTAACCTCAATAATTTAGA

роформом с последующим осаждением и обессоливанием. Осадок ДНК растворяли в деионизованной воде и использовали для видоспецифичного ПЦР на позвоночных.

Подбор праймеров. Методом видоспецифического ПЦР было необходимо выявить присутствие ДНК хозяина-прокормителя в клещах. В настоящей работе нами был проведен анализ на следующие виды позвоночных: *A. uralensis*, *C. glareolus*, *M. arvalis*, *S. araneus*, *F. coelebs*, *P. major*. Известно, что полиморфная область гена 12S рДНК является одним из молекулярных маркеров видов. Нами были подобраны универсальные праймеры для амплификации данной области, характерной для позвоночных:

Прямой праймер (1): CAAACTGGGATTAGATACC

Обратный праймер (2): GAGGGTGACGGGCGGT.

Указанная пара праймеров амплифицирует фрагмент длиной около 450 п. о. 12S рДНК позвоночных независимо от видовой принадлежности. Размер фрагмента мог незначительно варьировать в зависимости от вида объекта.

Далее нами были подобраны прямые видоспецифичные праймеры, позволяющие получить ожидаемый фрагмент только при условии наличия ДНК искомого вида в пробе (табл. 1).

Общая схема расположения праймеров в амплифицируемой области гена 12S рДНК представлена в табл. 2.

Амплификация ДНК. Первичная амплификация проводилась с парой универсальных праймеров, и были получены фрагменты в области 450 п. о.

ПЦР проводилась со следующими условиями реакционной смеси:

ДНК: 2 мкл (0.05—0.1 мкг/мкл),  $Mg^{2+}$ : 10мМ, праймеры: по 15пМ, Taq ДНК-полимераза: 2.5 ед. в амплификационном буфере (MBI Fermentas, Канада). Параметры реакции: 1×96 °C-3 мин, 5×(94 °C-40 с, 48 °C-25 с, 72 °C-1 мин), 5×(94 °C-30 с, 52 °C-30 с, 72 °C-1 мин), 30×(94 °C-30 с, 54 °C-30 с, 72 °C-1 мин), 1×72 °C-3 мин.

Далее 1 мкл амплификата использовался в качестве матрицы для второго раунда видоспецифичной амплификации, в которой обратным праймером являлся универсальный, а прямые — видоспецифичные. Амплификация велась по условиям, изложенным в табл. 3.

Таблица 2

Схема расположения праймеров в амплифицируемой области гена 12S рДНК

Table 2. Scheme of primers location in the amplified regions of 12S rDNA

		474		573
<i>Apodemus uralensis</i>	(416)	<b>CAAACTGGGATTAGATACC</b>	CCACTATGCTTAGCCCTAAACTTAAATAATTTTA-TAACAAAATATTTGCCAGAGAACTACTAGCTACT--GCTTAAAC	
<i>Clethrionomys glareolus</i>	(413)	<b>CAAACTGGGATTAGATACC</b>	CCACTATGCTTAGCCCTAAACTTCA-TCATTATA-AAACAAAAGTATTTGCCTGAGAACTACTAGCCACA--GCTTAAAC	
<i>Sorex araneus</i>	(424)	<b>CAAACTGGGATTAGATACC</b>	CCACTATGCTTAGCCCTAAACTCAGGTATTTAACCTAACAAAATACCCGCCAGAGAACTACTAGCAATA--GCTTAAAC	
<i>Fringilla coelebs</i>	(468)	<b>CAAACTGGGATTAGATACC</b>	CCACTATGCTTAGCCCTAAACTCTTGATGCTTACCCCTACTAAAGCATCCGCCGAGAACTACGAGCACAACGCTTAAAC	
<i>Parus major</i>	(1)	<b>CAAACTGGGATTAGATACC</b>	CCACTATGCTTAGCCCTAAACTCTTGATGCTCGATATTACCTGAGCGTCCGCCTGAGAACTACGAGCACAACGCTTAAAC	
<i>Microtus arvalis</i>	(1)	<b>CAAACTGGGATTAGATACC</b>	CCACTATGCTTAGCCCTAAACTCAATAATTTAG-AAACAAAATATTTGCCTGAGAACTACTGGCCACA--GCTTAAAC	
		574		673
<i>Apodemus uralensis</i>	(513)	TCAAAGGACTTGGCGGTACTTTATATCCATCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCC-GATCTACCTACCATCTCTTGCCAAATTCAGCCTAT		
<i>Clethrionomys glareolus</i>	(509)	TCAAAGGACTTGGCGGTACTTTATATCCATCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCC-GCTATACCTACCACTTGTCTAA-TTCAGCCTAT		
<i>Sorex araneus</i>	(522)	TCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCTGTA-TCGATAAACCCCGATAAACCTACCACTTGTCTAA-TTCAGCTTAT		
<i>Fringilla coelebs</i>	(568)	TCTAAGGACTTGGCGGTGCCCCAAACCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATGATCCAC-GATATACCTGACCATTCTTGC-CAAAACAGCCTAC		
<i>Parus major</i>	(101)	TCTAAGGACTTGGCGGTGCTCCAAACCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATGATCCAC-GATACACCTACCATTCCTTGCACAAAACAGCCTAT		
<i>Microtus arvalis</i>	(98)	TCAAAGGACTTGGCGGTACTTTATATCCATCTAGAGGAGCCTGTTCT-----		
		674		773
<i>Apodemus uralensis</i>	(612)	ATACCGCATCTTCAGCAAACC--CTAAAAAGGAACATAAGTAAGCACAGAACAAC-AC---ATTAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCAATGAGATGGG		
<i>Clethrionomys glareolus</i>	(607)	ATACCGCATCTTCAGCAAACC--CTAAAAAGGAATAAAAGTAAGCAAGAGATCA-CC---ATAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCAATGTGGTGGG		
<i>Sorex araneus</i>	(620)	ATACCGCATCTTCAGCAAACC--CTAAAAAGGCATAACAGTAAGCAAGAACATGAGAC---ATAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCTTATGAGGTGGG		
<i>Fringilla coelebs</i>	(666)	ATACCGCGTCGCGAGCTCACCTCCCCTGAAAGTCCAACAGTGAGCGCAATAGCCCCACCAAGCTAGTAAGACAGGTCAAGGTATAGCCTATGGAATGGG		
<i>Parus major</i>	(200)	ATACCGCGTCGCGAGCCACCCCTCCTGAGGGCCCAACAGTGGACGCAACAGCCCCC---GCTAATACGACAGGTCAAGGTATAGCCCATGGAATGGC		
<i>Microtus arvalis</i>	(145)	-----		

		774		873
<i>Apodemus uralensis</i>	(706)	AAGAAATGGGCTACATTTTCTTTAT--AAAGAA-CAT-CACGATATCCTTTATGAAACTAAAGGACGAAGGAGGATTTAGTAGTAAATTAAGAATAGAGA		
<i>Clethrionomys glareolus</i>	(701)	AAGCAATGGGCTACATTTTCTT-AC--CAAGAA-CAT-TACGCTACCCTTTATGAAACTAAAGGACAAAGGGGATTTAGTAGTAAATTAAGAATAGAGA		
<i>Sorex araneus</i>	(715)	AAGAAATGGGCTACATTTTCTATTA-ACTAGAA-CATTTACGAAAGTTATTATGAAACTAGTAACTAAAGGAGGATTTAGTAGTAAGTTGAGAATAGAGT		
<i>Fringilla coelebs</i>	(766)	A-GCAATGGGCTACATTTTCTAAGT---TAGAA-CAT-ACGGCAAAGGGGTATGAAATAACCCCTGGAAGGCGGATTTAGCAGTAAAGTGGGACAATCGA		
<i>Parus major</i>	(297)	A-GCAATGGGCTACATTTTCTAAGA---TAGAA-CAC-ACGGCAAAGGGGTATGAAACTACCCCTGGAAGGCGGATTTAGCAGTAAAGTGGGATAATCAA		
		874		922
<i>Apodemus uralensis</i>	(802)	GCTTAATTGAATTGAGCAATGAAGTACGCACAC		
<i>Clethrionomys glareolus</i>	(796)	GCTTAATTGAATAGAGCAATGAAGTACGCACAC		
<i>Sorex araneus</i>	(813)	GCTCAACTGAATCAGGCCATGAAGCACGCACAC		
<i>Fringilla coelebs</i>	(860)	GCCCTCTTTAAGCCGGCCCTGGGACACGTACAT		
<i>Parus major</i>	(391)	GCCCTCTTTAAGCCGGCCCTGGGACACGTACAT		
<i>Microtus arvalis</i>	(145)	-----		

Примечание. Темно-серым фоном и белым шрифтом отмечен прямой универсальный праймер, светло-серым — область обратного универсального праймера по прямой цели на позвоночных. Прямые видоспецифичные праймеры отмечены подчеркиванием.

Таблица 3  
Условия амплификации  
Table 3. Conditions of amplification

Виды	T <sub>d</sub>	Амплификация, 35°, град.-сек.			T <sub>e</sub>
		T <sub>d</sub>	T <sub>a</sub>	T <sub>s</sub>	
<i>Apodemus uralensis</i>	94—180	94—30	45—10	72—20	72—120
<i>Clethrionomys glareolus</i>			45—15		
<i>Sorex araneus</i>			49—20		
<i>Fringilla coelebs</i>			49—20		
<i>Parus major</i>			52—20		
<i>Microtus arvalis</i>			142—20		

Всего для каждого отдельного образца было поставлено по 6 видоспецифичных реакций амплификации. Наличие положительного сигнала ПЦР и его размер определяли при разделении амплификатов в 3%-ном агарозном геле. Для большинства реакций, характеризующих присутствие ДНК хозяина-прокормителя, в каждом отдельном образце клеща были получены амплификаты в ожидаемой области 400—430 п. о.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Амплификация каждого из 143 образцов выполнялась с использованием видоспецифичных по 12S рДНК митохондриальному гену праймеров, проанализированы 4 вида мелких млекопитающих (*Apodemus uralensis*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus arvalis*, *Sorex araneus*) и 2 вида воробьинообразных (*Fringilla coelebs*, *Parus major*) (табл. 4). Для 44 образцов (30.8 % материала) установлены хозяева-прокормители. Для 5 (3.5 %) клещей выявлено питание на двух видах хозяев в следующих сочетаниях: *A. uralensis*—*M. arvalis*, *S. araneus*—*P. major*, *S. araneus*—*A. uralensis*, *M. arvalis*—*C. glareolus* (2 особи). Отрицательный результат видоспецифичного ПЦР для остальных образцов может являться свидетельством наличия другого вида хозяина-прокормителя, не предусмотренного использованной нами схемой амплификации.

Эффективность метода, по результатам западных исследователей (Cadenas et al., 2007; Humair et al., 2007), составляет в среднем 43.6—49 % и зависит от сезона активности имаго. Для *I. ricinus*, имаго которого проявляет активность весной и осенью, наибольшую эффективность определения отмечают именно для этих периодов, 93 и 73 % соответственно, что объясняют более коротким периодом со времени питания нимф до активизации перелинявших имаго и лучшей сохранностью материала для определения ДНК, чем в конце активности (20 % в июле).

Несмотря на неполный список прокормителей, используемый нами, эффективность в нашем случае оказалась достаточно высокой, что подтверждает актуальность данного метода для исследования прокормителей таежного клеща. Кроме того, исследовали клещей, нимфы которых могли питаться осенью предыдущего года, так что продолжительность периода



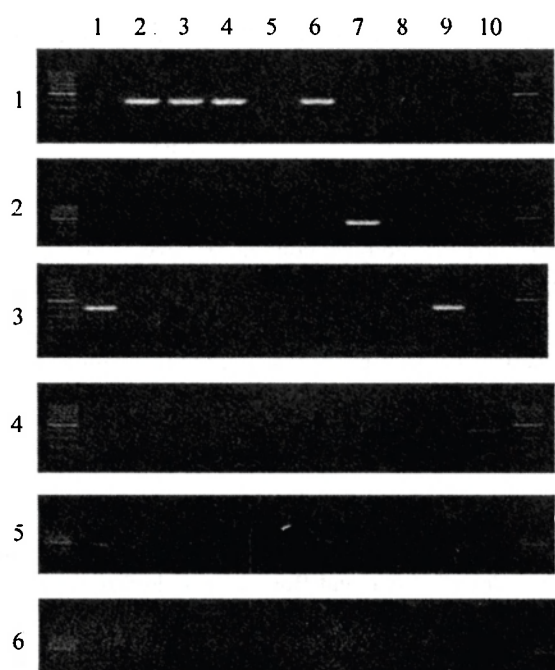
Таблица 4

Идентификация ДНК хозяина из голодных имаго  
*I. persulcatus*, собранных в 2008—2009 гг.  
 в Санкт-Петербурге и его окрестностях

Table 4. Identification of host DNA in hungry imago  
 of *I. persulcatus* collected in 2008—2009 years  
 in Saint-Petersburg and its suburbs

Вид хозяина-прокормителя	Количество клещей, у которых обнаружена ДНК прокормителя, особи (%)
<i>Apodemus uralensis</i>	13 (9.1)
<i>Clethrionomys glareolus</i>	8 (5.6)
<i>Microtus arvalis</i>	3 (2.1)
<i>Sorex araneus</i>	20 (14.0)
<i>Fringilla coelebs</i>	3 (2.1)
<i>Parus major</i>	5 (3.5)

от питания до определения материала составляет примерно 8—9 мес. Значение мелких млекопитающих для питания нимф *I. persulcatus* в нашем регионе оказывается существенным, по нашим данным, они прокармливают более 30 % активных нимф (табл. 4), причем наибольшую роль играют *A. uralensis* и *S. araneus* (см. рисунок).



Электрофореграммы ПЦР идентификации ДНК хозяина с использованием 12S рДНК.

1—10 — порядковый номер исследованного клеща; 1—6 — вид хозяина-прокормителя, по порядку: *Sorex araneus*, *Apodemus uralensis*, *Microtus arvalis*, *Parus major*, *Clethrionomys glareolus*, *Fringilla coelebs*.

Electrophoregrams of PCR identification of host DNA with 12S rDNA.

Факты питания личинок, нимф и имаго последовательно на двух хозяевах, что происходит при неудачном питании на первом хозяине и счесывании им паразита, наблюдались нами при лабораторных кормлениях клещей, когда они не ограничиваются на теле прокормителя повязкой или тубусом и могут свободно распределяться по телу животного. Как видно из нашей работы, у таежного клеща также возможно повторное присасывание, которое на рассмотренных видах прокормителей отмечено в 11.4 % случаев питания. Каденас с соавт. (Cadenas et al., 2007) отмечает определение ДНК более чем одного хозяина у 20 % исследованных клещей. Повторное присасывание, наряду с совместным питанием (Randolph et al., 1996), у клещей имеют исключительное значение при трансмиссии возбудителей инфекций, так как в результате подобных явлений увеличивается число членов эпизоотических процессов, что способствует сохранению и поддержанию природных очагов в природе.

Следует отметить, что методика ПЦР амплификации видоспецифичных по 12S рДНК праймеров с материалом из голодных имаго таежного клеща позволяет точно определить вид позвоночного, на котором питались нимфы клещей. Продолжение подобной работы требует расширения числа праймеров, видоспецифичных для потенциально возможных других видов хозяев.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 08-04-00148а и 11-04-00521а).

## Список литературы

- Балашов Ю. С. 1998. Иксодовые клещи — паразиты и переносчики инфекций. СПб. 287 с.
- Балашов Ю.С. 2010. Значение популяционной структуры иксодовых клещей (Parasitiformes, Ixodidae) для поддержания природных очагов инфекций. Зоол. журн. 89 (1): 18—25.
- Григорьева Л. А. 2004. Морфофункциональные изменения кишечника нимф клещей рода *Ixodes* (Acari: Ixodidae) во время и после питания. Паразитология. 38(3): 219—224.
- Григорьева Л. А. 2009. Морфофункциональные изменения кишечника клещей иксодов (Acari: Ixodidae) на протяжении жизненного цикла. Паразитология. 43 (5): 411—417.
- Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae): Морфология, систематика, экология, медицинское значение / Под ред. Н. А. Филипповой. 1985. Л. 416 с.
- Cadenas F. M., Rais O., Humair P. F., Douet V., Moret J., Gern L. 2007. Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). Journ. Med. Entomol. 44 (6): 1109—1117.
- Humair P. F., Douet V., Cadenas F. M., Schouls L. M., Pol I., Gern L. 2007. Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. Journ. Med. Entomol. 44 (5): 869—880.
- Kirstein F., Gray J. S. 1996. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4060—4065.



- Pichon B., Egan D., Rogers M., Gray J. 2003. Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Journ. Med. Entomol.* 40: 723—731.
- Pichon B., Rogers M., Egan D., Gray J. 2005. Blood-veal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5: 172—180.
- Randolph S. E., Gern L., Nuttall P. A. 1996. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today.* 12 (12): 472—479.
- Wickramasekara S., Bunikis J., Wysocki V., Barbour A. G. 2008. Identification of residual blood proteins in ticks by mass spectrometry proteomics. *Emerging infectious diseases.* 14 (8): 1273—1275.

PCR IDENTIFICATION OF DNA OF HOSTS OF THE TAIGA TICK NYMPHS  
(*IXODES PERSULCATUS*: IXODINAE) IN St. PETERSBURG  
AND ITS SUBURBS

L. A. Grigoryeva, A. V. Markov

*Key words:* ixodid ticks, host-parasite relations, *Ixodes persulcatus*, polymerase chain reaction.

SUMMARY

PCR identification of host DNA in unfed females and males of taiga tick *Ixodes persulcatus* was performed. Amplification of each sample was done using primers species-specific by 12S rDNA mitochondrial gene. Four species of small mammals (*Apodemus uralsensis*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus arvalis*, and *Sorex araneus*) and two passeriform bird species (*Fringilla coelebs* and *Parus major*) were analysed. For one third of tick samples, hosts of previous stages were established using this method. In five cases, feeding on more than one host species was detected.